

氏名	吉 濱 泰 斗
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第 1334 号
学位授与の日付	平成7年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻（学位規則第4条第1項該当）
学位論文題名	口腔扁平上皮癌および口腔白板症におけるp53 遺伝子に関する研究
論文審査委員	教授 松村智弘 教授 岸 幹二 教授 永井教之

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

癌の発生は、癌遺伝子や癌抑制遺伝子などの細胞の分化や増殖を制御する遺伝子異常の蓄積、すなわち多段階発癌によって引き起こされると考えられている。そのうち癌抑制遺伝子の一つであるp53の遺伝子産物（P53蛋白）はDNAの傷害などにより誘導され、いくつかの蛋白を介して細胞周期をG1期に止め細胞の増殖を抑制しDNAの傷害が娘細胞へ受け継がれるのを阻止すると考えられている。しかし、p53遺伝子に変異が存在する変異型P53蛋白はこの機能を失っており、細胞の増殖が制御できなくなるため、p53遺伝子およびP53蛋白の異常が癌の発生に関与していると考えられている。

これら多段階発癌に関する癌遺伝子・癌抑制遺伝子については大腸の家族性ポリポーシスモデルにおける健常粘膜、腺腫、大腸癌で研究されてきている。そこで口腔領域悪性腫瘍の大部分を占める扁平上皮癌の発生とp53遺伝子およびP53蛋白の異常の関連を検討する目的で、口腔扁平上皮癌症例およびその前癌病変と考えられている口腔白板症症例についてPCR-SSCP法によるp53遺伝子点突然変異の検索およびP53蛋白の免疫組織化学的検索を行った。また正常型P53蛋白と結合能を持ち、その過剰発現によりP53蛋白を機能的に不活化するといわれている癌遺伝子mdm2遺伝子産物（MDM2蛋白）についても免疫組織化学的検索を行った。

【材料および方法】

口腔扁平上皮癌42症例および口腔白板症11症例と健常口腔粘膜10症例を対象とした。

1, 腫瘍組織からのDNAの抽出：凍結材料より組織切片を作製し、Goelzらの方法に準じてDNAの抽出を行いp53遺伝子点突然変異の検索に用いた。なお陽性コントロールとしてp53遺伝子に点突然変異の存在が確認されているヒト赤白血病細胞株K562およびヒト外陰部由来扁平上皮癌細胞株A431を、また陰性コントロールとしてヒト正常線維芽細胞株TIG7を用い、同様の方法でDNAを抽出し、p53遺伝子の解析に用いた。

2, PCR-SSCP法によるp53遺伝子変異の検索：p53遺伝子には11のエクソンが存在し、そのうち変異の大部分が集中するエクソン5～8までをそれぞれPCR法にて増幅した後、PCR産物を95℃で熱変性させ、8%ポリアクリルアミドゲル中にて電気泳動し、銀染色にて遺伝子点突然変異の検出を行った。

3, 免疫組織化学的検索：生検および手術から得られた凍結材料より4 μ mの組織切片を作製し免疫組織化学的染色に用いた。P53蛋白の免疫組織化学的染色には一次抗体として抗P53モノクローナル抗体PAB1801を, またMDM2蛋白には一次抗体として抗MDM2モノクローナル抗体1F2を使用し, SAB法により行った。

4, 臨床・病理組織学的因子とp53遺伝子点突然変異検索結果およびP53蛋白の免疫組織化学的検索結果との関係：臨床・病理組織学的因子とp53遺伝子点突然変異検索結果およびP53蛋白の免疫組織化学的検索結果に関して統計学的な検討を行った。なお統計処理には χ^2 検定を用いた。

【結果および考察】

1, p53遺伝子点突然変異検索結果：健常口腔粘膜ではp53遺伝子点突然変異は検出されなかったが, 口腔白板症症例において11症例中1例(9%)に, また口腔扁平上皮癌症例では42症例中13例(31%)に点突然変異を認めた。

2, 免疫組織化学的検索結果：健常口腔粘膜ではP53蛋白の陽性所見は認められなかったが, 口腔白板症症例では11例中4例(36%)に, また口腔扁平上皮癌症例では42症例中22例(52%)に陽性所見を認めた。なお口腔白板症の4例の陽性症例中2例は悪性化した症例であった。MDM2蛋白の検索では, 健常口腔粘膜上皮との比較により, 口腔白板症11例中3例(27%), 口腔扁平上皮癌42例中17例(40%)に過剰発現を認めた。

3, 口腔扁平上皮癌においてP53蛋白の免疫組織化学的陽性所見が認められるがp53遺伝子変異が検出できなかった11症例のうち7症例にMDM2蛋白の過剰発現が認められた。また口腔白板症でもP53蛋白陽性例3例中2例にMDM2蛋白の過剰発現が認められた。

4, 臨床, 病理組織学的因子とp53遺伝子点突然変異検索結果およびP53蛋白の免疫組織化学的検索結果との関係：浸潤様式とP53蛋白の免疫組織化学的染色結果の間に相関が認められた。

以上の結果, p53遺伝子点突然変異およびP53蛋白陽性所見が共に健常口腔粘膜において認められず, 前癌病変といわれる口腔白板症および口腔扁平上皮癌に認められ, またそれらの検出率が口腔白板症より口腔扁平上皮癌の方が高く, さらに, 口腔白板症でP53の異常を認める症例は4例中2例が悪性化したことより, p53遺伝子およびP53蛋白の異常が, 口腔扁平上皮癌の発生に関与していることが示唆された。またP53蛋白の免疫組織化学的陽性を引き起こす要因として, p53の遺伝子異常のみならずMDM2蛋白の関与が考えられた。

P53蛋白の免疫組織化学的検索結果と腫瘍の浸潤様式との間に相関が認められたことからP53蛋白の免疫組織化学的検索が治療方針決定の際, その指針の一助となる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

本研究は、口腔扁平上皮癌とその前癌病変と考えられている口腔白板症における癌抑制遺伝子であるp53遺伝子の点突然変異とP53蛋白質およびP53蛋白質発現と密接な関係を有すると考えられるMDM2蛋白質について検討したものである。

p53遺伝子点突然変異の検索にはPCR-SSCP法を用い、P53蛋白質およびMDM2蛋白質の検索に関しては免疫組織化学的に行った。p53遺伝子点突然変異の検出率は健常口腔粘膜0%、口腔白板症9%、口腔扁平上皮癌31%であり、P53蛋白質の免疫組織化学的陽性率は、健常口腔粘膜0%、口腔白板症36%、口腔扁平上皮癌52%であった。また、P53蛋白質が免疫組織化学的に陽性であった白板症4症例のうち2症例は後に悪性化し、扁平上皮癌に移行した。口腔扁平上皮癌症例でP53蛋白質が免疫組織化学的に陽性であった症例は統計学的有意差をもって山本・小浜の分類で索状あるいはび慢性浸潤を示した。一方、p53遺伝子点突然変異が認められずP53蛋白質が免疫組織化学的に陽性を示すものがあり、これらの64%にMDM2蛋白質の過剰発現を認めたことから、P53蛋白質の発現にはMDM2蛋白質の関与が示唆された。

以上の知見は、p53遺伝子およびP53蛋白質と健常口腔粘膜、白板症、扁平上皮癌との関与の一部を解明するとともに、p53遺伝子およびP53蛋白質の検索が臨床的に診断あるいは治療指針の一助となり得ることを示唆し、価値ある業績と認められる。よって、本研究者は博士（歯学）の学位を得る資格があると認める。